

Approved For Release 2009/08/04 : CIA-RDP80T00246A009700450002-4

25X1

**Page Denied**

Next 1 Page(s) In Document Denied

Approved For Release 2009/08/04 : CIA-RDP80T00246A009700450002-4

Академия наук СССР  
Успехи современной биологии  
Том V, 1958 Вып. I

В. Кошаров

ИЗМЕНЕНИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ ТКАНЕЙ ЖИВОТНЫХ  
В ОНТОГЕНЕЗЕ

## УСПЕХИ СОВРЕМЕННОЙ БИОЛОГИИ

ТОМ XLV

1958

ВЫП. I

ИЗМЕНЕНИЕ АНТИГЕННЫХ СВОЙСТВ ТКАНЕЙ ЖИВОТНЫХ  
В ОНТОГЕНЕЗЕ

Б. В. КОНЮХОВ (Москва)

## ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время еще довольно широко распространено мнение, что в задачи иммунологии входит лишь изучение вопросов, связанных с невосприимчивостью организма к инфекционным заболеваниям. Однако на протяжении последних нескольких десятилетий в иммунологии накопилось много фактов, указывающих на то, что иммунитет представляет, как это указывал еще И. И. Мечников, общебиологическое явление.

На основании своих наблюдений над внутриклеточным пищеварением у беспозвоночных животных И. И. Мечников (1883) считал, что на ранних стадиях филогенеза все клетки организма имели внутриклеточное пищеварение и что по мере усложнения организации животных в ходе эволюции эта способность к внутриклеточному пищеварению сохранилась лишь у определенных клеток — фагоцитов, которые стали выполнять защитную функцию. В последнее время А. К. Дондуа (1955) было установлено, что в онтогенезе наблюдаются некоторые сходные этапы развития реакции фагоцитоза.

Вторым основным фактором специфического иммунитета являются антитела, которые вырабатываются против чужеродных белков, попавших в кровяное русло данного организма. Если представить себе, как это делал И. И. Мечников, что реакция фагоцитоза развилась на основе общебиологического явления внутриклеточного пищеварения, то следует также думать, что и реакция антиген — антитело возникла на основе какого-то общего биологического феномена (Вязов, 1956, а).

Как известно, антитела в качестве защитных элементов начинают вырабатываться против чужеродных белков, попавших в кровяное русло организма, относительно поздно как в фило-, так и в онтогенезе. Можно предположить, что точно так же, как фагоциты развились на основе внутриклеточного пищеварения, так и выработка антител в своем происхождении базируется на общем свойстве всех тканей отвечать реакцией на чужеродные белковые вещества вообще. Так как в ходе развития происходит непрерывный процесс новообразования белковых веществ, которые в определенный промежуток времени оказываются относительно «чужеродными» по отношению к остальным белкам организма, то возникает вопрос: не является ли этот процесс новообразования белков той общебиологической основой, на которой возникло образование антител?

Н. Жуков-Вережников (1944, 1956) высказал гипотезу о существовании первичной иммунологической реактивности, служащей той основой, на которой возникла вторичная иммунологическая реактивность. Вторичная иммунологическая реактивность проявляется, в частности, в форме образования иммунных антител в ответ на иммунизаторное раздражение. Согласно этой гипотезе, на разных этапах фило- и онтогенеза новообразующиеся белковые тела вступают в иммунологические отношения с белками «старыми», «исходными» по типу реакции антиген — антитело; и как результат этого взаимодействия между «старыми» и «новыми» белка-

ми в развивающемся организме, в частности, образуются нормальные антитела. Следует также указать на интересную статью Г. В. Лопашова и О. Г. Строевой (1950), где авторы, в связи с вопросом о несовместимости тканей при пересадках, сделали попытку создать представление о возникновении иммунологических реакций в онтогенезе.

В литературе имеются данные, свидетельствующие о том, что ряд биологических процессов, как, например, оплодотворение (см. Tyler, 1948) и рост (Weiss, 1947, 1955), протекает с участием реакции типа антиген—антитело. Эти данные, как и ряд других, позволили выдвинуть некоторым авторам рабочие гипотезы об активном участии иммунологических отношений в формообразовательных процессах (Tyler, 1947; Weiss, 1947, 1950). Эти вопросы были освещены уже в статье О. Е. Вязова «Введение к изучению иммунологии эмбриогенеза», опубликованной в 1952 г.

Изучение антигенных свойств развивающихся тканей является первым необходимым шагом на пути к установлению роли иммунологических отношений в формообразовательных процессах. Как известно, антигеном называется любой биохимический комплекс высокомолекулярных веществ, в основном, белков, который при парентеральном введении, будучи чужеродным для данного организма в видовом, органном или другом отношении, способен вызывать специфическую иммунологическую реакцию организма. Отсюда вытекает, что любое изменение биохимических свойств тканей животных в процессе онто- и филогенеза непременно должно сопровождаться изменением их антигенных свойств. Поэтому изучение антигенных свойств развивающихся тканей, наряду с выяснением роли иммунологических отношений в формообразовательных процессах, должно способствовать пониманию динамики морфогенеза, так как позволяет выявлять те ранние и скрытые от глаз морфолога биохимические изменения тканей, которые и приводят в конце концов к возникновению новых структур.

В настоящей статье мы остановимся лишь на изложении данных, касающихся антигенных свойств развивающихся тканей человека и различных животных, так как обзорных статей по этому вопросу в советской научной литературе нет<sup>1</sup>.

Следует отметить, что в зарубежной литературе было опубликовано в последнее время несколько таких сводок (Woerdeman, 1953; Schechtman, 1955; Tyler, 1955; Nace, 1955).

#### АНТИГЕНЫ, ПРИСУТСТВУЮЩИЕ НА ВСЕХ ЭТАПАХ РАЗВИТИЯ

Вопрос об изучении антигенных свойств тканей на различных этапах онтогенеза возник в научной литературе сравнительно недавно. Первые работы в этом направлении были опубликованы в начале нашего столетия. Так, Рессле (Rössle, 1905) установил антигенное сходство тканей эмбрионов и взрослых животных. Он иммунизировал кроликов и морской коник суспензиями куриных и свиных эмбрионов и отметил высокую видоспецифичность полученных сывороток.

Купер (Cooper, 1946, 1948, 1950) показала при помощи реакции кольцеобразования и реакции преципитации в агаровых колонках, что в яйцеклетках и тканях эмбрионов и личинок лягушки содержатся антигены, идентичные антигенам сыворотки взрослой лягушки. Используя эту же методику, Перльман (Perlmann, 1953) нашел общие антигены, которые присутствовали на всех изученных стадиях развития морского ежа. Спраг (Sprag, 1953) установил два общих антигена для различных стадий развития лягушки.

<sup>1</sup> Мы не останавливаемся на основных понятиях и методах иммунологии, так как они рассмотрены в целом ряде монографий (Н. Ф. Гамалея, «Основы иммунологии», 1928; Л. Н. Зильбер, «Основы иммунологии», 1948; В. Бойд, «Основы иммунологии», 1949; П. Н. Косыков, «Антигенные вещества организма и их значение в биологии и медицине», 1954, и др.).

Тельфер и Виллиамс (Telfer a. Williams, 1953) нашли при помощи реакции преципитации в агаровых колонках, что на различных стадиях онтогенеза шелкопряда (*Platysamia secropia*) присутствует пять общих антигенов. Аналогичные результаты, говорящие о наличии определенных общих антигенов, характерных для всех стадий онтогенеза, получены Шехтманом (Schlechtman, 1947), Нейсом и Шехтманом (Nace a. Schlechtman, 1948) и Нейсом (Nace, 1953). При помощи реакции преципитации эти исследователи установили, что в сыворотке куриного эмбриона и взрослой курицы содержатся общие антигены вителлоидной природы. Шехтман и Нейс считают эти общие для всех стадий онтогенеза антигены «прародителями» всех других антигенов.

В последнее время Миллером (Miller, 1953), изучавшим становление антигенного состава эритроцитов голубя, было установлено, что видоспецифические антигены можно обнаружить на стадии 29 сомитов (72 часа инкубации), т. е. на самой ранней стадии развития, на которой удается собрать кровь для исследования. Аналогичные результаты были получены также на курах (Briles, McGibbon a. Irwin, 1948). Гардинг, Гардинг и Перльман (Harding, Harding a. Perlmann, 1954), показали при помощи реакции преципитации в агаровых колонках, что видоспецифические антигены в эмбрионах гибридов морских ежей можно обнаружить уже на стадии бластулы. Авторы отмечают, что на этой стадии развития еще нельзя обнаружить морфологических признаков, характерных для каждого из родительских видов.

Таким образом, изучение антигенных свойств тканей в процессе онтогенеза показало, что на всех стадиях развития присутствуют общие или сходные антигены. Анализ литературных данных позволяет нам сделать заключение, что эти общие антигены представляют собой видоспецифические антигены. Трудно себе представить, что ткани эмбрионов не содержат видоспецифических антигенов, так как процесс развития начинается с момента слияния половых клеток, антигенная видоспецифичность которых доказана (Мечников, 1900, а, б; Добровольский, 1907; Kodama, 1913, и др.). Поэтому ясно, что зигота и развивающиеся ткани должны также содержать видоспецифические антигены. Здесь следует указать, что видоспецифические антигены отражают видовую морфо-физиологическую специфику развития животных. Это положение было подтверждено результатами наших опытов (Конюхов, 1956 а, б, в). Было установлено, что развивающиеся ткани хрусталика утки и сердца курицы на всех изученных этапах онтогенеза, начиная с 72 часов инкубации обладают антигенной видоспецифичностью. Антигенная видоспецифичность изменяется в процессе развития характерным для каждого органа образом. Так, например, в процессе развития антигенная видоспецифичность тканей развивающегося сердца несколько повышается. Антигенная видоспецифичность хрусталика, наоборот, снижается после 264 часов инкубации, когда в центральной части хрусталика исчезают клеточные ядра и образуется склерозирующееся «ядро», которое в ходе дальнейшего развития уплотняется и увеличивается в размере. Можно думать, что снижение видоспецифических свойств хрусталика связано с процессом дегенерации ядер. В связи с этим представляют интерес данные Шехтмана и Нишихара (Schlechtman a. Nishihara, 1955). Эти авторы установили, что ядра и цитоплазма животных клеток отличаются одно от другого по своим антигенным свойствам, что в ядрах присутствует специфичный «ядерный антиген», который обладает резко выраженной видовой антигенной специфичностью.

#### АНТИГЕНЫ, ВОЗНИКАЮЩИЕ В ПРОЦЕССЕ РАЗВИТИЯ

Помимо антигенов, общих для всех стадий онтогенеза, в тканях взрослого организма имеются также антигены, отсутствующие на ранних этапах эмбрионального развития. Они возникают на определенных стадиях раз-

вития и присутствуют после этого у животных на всех последующих этапах онтогенеза. Так, И. Л. Кричевский (1916, 1923) сообщил, что гетерогенный антиген Форсмана появляется в процессе развития куриного эмбриона лишь на 4-й день инкубации. Однако данные Кричевского не согласуются с рядом работ других авторов (Iwae, 1915; Idzumi, 1924; Bornstein a. Schockaert, 1929; Witebsky et Szepesenwol, 1934), которые нашли антиген Форсмана на более ранних стадиях развития куриного эмбриона и даже в зародке. Поэтому вопрос о времени появления гетерогенного антигена, к сожалению, пока еще нельзя считать решенным.

Значительное количество работ посвящено изучению происхождения групповых и типовых антигенов человека. Различные авторы приводят разные сроки появления групповых антигенов в эмбриогенезе у человека: Земцова и Терехова (1928) — 6 месяцев; Schockaert (1929) — 5 месяцев; Kemp (1930) — в начале 2-го месяца; Idzumi (1935) — 1,5 месяца; Файнберг (1935) — в конце 2-го месяца; Трибулев (1939) — в конце 3-го месяца; Bornstein a. Israel (1942) — 1,5 месяца. Сроки появления типовых антигенов (M и N), по данным различных авторов, также разные: Schockaert (1929) — 3 месяца; Bornstein a. Israel (1942) — 1,5—2,5 месяца; Косяков и Трибулев (1939) — в конце 3-го месяца; Bornstein a. Israel (1942) — 1,5 месяца.

Как видно из вышеприведенных литературных данных, вопрос о времени появления в эмбриогенезе групповых и типовых антигенов пока еще не может считаться решенным, так как сроки появления этих антигенов, по данным многих авторов, сильно расходятся. Это расхождение, видимо, объясняется тем, в частности, что различные авторы применяли иммунологические методы исследования, обладающие неодинаковой чувствительностью. Однако подавляющее большинство авторов считает, что групповые и типовые антигены возникают на определенных этапах онтогенеза.

Следует указать, что в последнее время была опубликована интересная работа Зандера, в которой совершенно по-иному ставится вопрос о развитии групповых и типовых антигенов (Sander, 1953). Автор изучено 126 эмбрионов человека различного возраста и установил, что у всех эмбрионов до 3 месяцев развития в эритроцитах имеются антигены A, B и M, N и только в процессе дальнейшего развития эмбриона происходит процесс исчезновения тех или иных антигенов. Аналогичные данные автор получил также при изучении эмбрионов свиньи. Если данные Зандера подтвердятся, то они будут иметь очень большое значение для понимания вопроса о возникновении и развитии групповых антигенов и нормальных антител. Таким образом, в связи с публикацией работы Зандера вопрос о возникновении групповых и типовых антигенов остается открытым.

В последние годы была опубликована серия работ по изучению специфических антигенов животных в процессе развития. Было показано возникновение определенных тканевых антигенов на разных этапах онтогенеза. Рядом авторов было показано, что в процессе развития в их тканях происходит процесс закономерного появления определенных антигенов. Фликингер и Нейс (Flickinger a. Nace, 1952) при исследовании реакции коагглюляции установили, что в ходе развития лягушки в протоплазме ее возникает новый антиген. Другой автор сообщает, что антиген возникает между оплодотворением и вылуплением личинки.

Спар (Spar, 1953), исследуя антигенные свойства тканей лягушки (Rana ripiens) при помощи реакции преципитации в агаровых колодцах, обнаружил появление новых антигенов на стадиях гаструлы и нейрулы. Аналогичные данные были получены Клейтон (Clayton, 1953) на Triturus alpestris; она сообщила, что между стадиями гаструлы и нейрулы, перед нейруляцией и между стадиями нейрулы и почки возникают новые антигены. По данным Клейтона, антигены, возникающие на этих стадиях, являются гетерогенными.

ные для зародышевых листков (эктодермы и мезодермы) и для нервной пластинки, могут быть обнаружены в эмбрионе перед появлением этих структур.

Возникновение новых антигенов в процессе развития было установлено также при изучении антигенных свойств тканей эмбрионов и личинок морских ежей (Perlmann a. Gustafson, 1948; Perlmann, 1953), эритроцитов куриных эмбрионов и цыплят (Briles, McGibbon a. Irwin, 1948), сыворотки куриных эмбрионов (Schechtman, 1947; Schechtman, 1952; Schechtman a. Hoffman, 1952; Nace, 1953).

Из работ, посвященных изучению антигенных свойств сыворотки эмбрионов, особого внимания заслуживает работа Нейса (Nace, 1953). Автор получал иммунные сыворотки против различных фракций сыворотки крови взрослой курицы. При помощи реакции преципитации было установлено, что одни антигены (сывороточные альбумины) можно обнаружить на 5-й день инкубации, другие антигены (сывороточные  $\alpha$ -,  $\beta$ -глобулины) — на 6-й день инкубации, и третьи антигены (сывороточные  $\gamma$ -глобулины) — между 9—12 сутками инкубации. Эти данные о появлении сывороточных белков в эмбриогенезе согласуются с результатами других авторов, использовавших в своих исследованиях метод электрофореза (Moore, Shen a. Alexander, 1945).

В последнее время в литературе были опубликованы работы, посвященные изучению органоспецифических антигенов в процессе развития. Теперь уже можно считать твердо установленным, что в различных органах животных присутствуют характерные для них органоспецифические антигены (Хорошко, 1910; Вовк, 1938; Патрикеев, 1952, и др.). Однако процесс возникновения и развития этих органоспецифических антигенов в ходе онтогенеза изучен еще очень слабо, а существующие данные по этому вопросу противоречивы.

Первая большая работа, посвященная изучению процесса развития органоспецифических антигенов, была опубликована Барки, Саливэном, Питерсеном и Уидом (Burke, Sullivan, Petersen a. Weed, 1944). Эти авторы изучали при помощи реакций преципитации и связывания комплемента антигенные свойства различных органов куриного эмбриона (гонады, почки, мозг и др.). На основании полученных данных они сделали заключение, что органоспецифические антигены не возникают в процессе развития до тех пор, пока тот или иной орган не приобретет морфологическое строение, свойственное ему во взрослом состоянии.

Шехтман (Schechtman, 1948) сообщил, что он нашел «общеорганный антиген», который является общим для всех развивающихся органов куриного эмбриона (мозга, сердца, печени и скелетной мышцы). Однако данные Барки с сотрудниками (Burke a. oth. 1955) и Шехтмана не были подтверждены Эбертом (Ebert, 1950, 1951, 1952, 1953) и другими исследователями. Возможно, что противоречивость данных Шехтмана и других авторов связана с тем, что Шехтман использовал недостаточно надежные методы адсорбции иммунных сывороток. Эберт, используя метод культивирования тканей и реакцию преципитации, так же как и Барки с сотрудниками, показал, что в определенных органах куриного эмбриона (сердце, мозг, селезенка) присутствуют специфичные для них антигены. Однако эти антигены, в противоположность данным Барки с сотрудниками, он обнаружил уже в ранней куриной бластодерме. Автор утверждает, что эти антигены возникают еще до появления соответствующих органов или их закладок. В другой работе Эберт (Ebert, 1951) сообщил о возникновении новых антигенов в селезенке и мозге куриного эмбриона на 18-й день инкубации. При помощи реакции преципитации в агаровых колонках им было также установлено, что в развивающейся селезенке куриного эмбриона образуется по крайней мере три новых антигена между 12 и 18 сутками инкубации (Ebert, 1952).

В последнее время ряд авторов опубликовал результаты исследований,

посвященных изучению органоспецифических антигенных свойств хрусталика в онтогенезе. Следует отметить, что становление антигенных свойств ткани развивающегося хрусталика изучено значительно лучше, чем других органов. Поэтому мы остановимся на этом органе более подробно. Так, Барки, Салливан, Питерсен и Уид (Burke, Sullivan, Peterson and Weed, 1944) сообщили, что антигены, свойственные хрусталику взрослой курицы, можно обнаружить при помощи реакции преципитации. В хрусталиках эмбрионов только после 250 часов инкубации, а при помощи реакции связывания комплемента — после 160 часов развития. Авторами установлено, что по мере развития хрусталика антигенная органоспецифичность его увеличивается и достигает своего окончательного завершения к эмбрионам 330 часов инкубации. Экстракты из хрусталиков эмбрионов этого периода развития реагировали с сывороткой против хрусталиков взрослой курицы, так же как и экстракты из хрусталиков курицы. Морфологическое строение хрусталиков эмбрионов к моменту обнаружения антигенов, свойственных definitivoму хрусталику, становится в основных чертах сходным с хрусталиком взрослой курицы. То же установлено было Барки, Салливан, Питерсен и Уид и для хрусталика лягушки. Исходя из результатов своих исследований, как уже отмечалось выше, они сформулировали положение, согласно которому антигены, присущие органам взрослого животного, возникают только в тот период развития, когда эти органы у эмбриона приобретут морфологическое строение, свойственное им во взрослом состоянии.

Однако результаты исследований тен Кейта и ван Доренмалена (ten Cate and van Doornmalen, 1950) не согласуются с этим положением. Используя реакцию микропреципитации, тен Кейт и ван Доренмален установили, что антигены, свойственные хрусталику курицы и лягушки, возникают в ходе развития задолго до того, как хрусталик приобретает свое definitivoное строение. Они показали, что хрусталиковые антигены курицы и лягушки можно обнаружить в хрусталиковом пузырьке. Независимо была опубликована работа Фликкингера, Леви и Смита (Flickinger, Levi and Smith, 1955), посвященная изучению антигенных свойств хрусталиков курицы и лягушки в эмбриогенезе. Авторы при помощи реакции преципитации получили данные, которые полностью согласуются с результатами опытов тен Кейта и ван Доренмалена. Данные тен Кейта и ван Доренмалена и Фликкингера, Леви и Смита были подтверждены результатами наших опытов (Конюхов, 1956, б. в). Кроме того, при помощи реакции анафилактики нами было установлено, что небольшое количество органоспецифических антигенов, свойственных хрусталику взрослой утки, можно обнаружить в головных частях эмбрионов уже на стадиях 23 и 25 часов (72 часа инкубации). В этот период развития наблюдаются первые признаки инвагинации хрусталиковой плакоды. Результаты этих опытов, а также изучение морфогенеза хрусталика позволили высказать предположение, что органоспецифические антигены хрусталика возникают одновременно с формированием хрусталиковой плакоды.

В литературе имеются исследования, результаты которых говорят в пользу такого предположения. Вурдеман (Woerdeman, 1950) изучил интересные, хотя и предварительные данные, по этому вопросу на лягушках. Опыты ставились следующим образом. Из эмбрионов аксолотля выделались отдельно хрусталиковая эктодерма и глазные пузыри. Эмбрионы были взяты на такой стадии развития, когда глазной пузырь и хрусталиковая эктодерма еще не соприкасаются друг с другом. Из хрусталиковой эктодермы и глазных пузырей готовились водно-солевые экстракты, которые при помощи реакции кольцепреципитации с иммунной сывороткой против хрусталика аксолотля исследовались на содержание органоспецифических антигенов хрусталика. Ни в одном случае не было обнаружено присутствие антигенов, свойственных хрусталику аксолотля. После этого опыт был видоизменен. Водно-солевые экстракты из эктодермы и



глазных пузырей смешивались и смесь ставили в термостат на 24 часа. Для контроля эти же экстракты ставились в термостат отдельно. После 24-часового стояния пробирок в термостате экстракты при помощи реакции коагпреципитации с иммунной сывороткой против хрусталика аксолотля исследовались на наличие в них хрусталиковых антигенов. В опытных пробирках наблюдалась положительная реакция преципитации, в контрольных же пробирках положительной реакции не было. Исходя из полученных данных, Вурдеман сделал предварительное заключение, что антигены, свойственные хрусталику аксолотля, возникают в клетках головной эктодермы лишь после воздействия на них веществ глазного пузыря.

Как известно, общепринятым является мнение, что наличие в органах специфичных для них антигенов, связано с определенной функцией этих органов. Возникает вопрос: с чем связано такое раннее появление хрусталиковых антигенов, так как функциональное отправление хрусталика начинается значительно позднее — лишь в постэмбриональный период развития. Казалось бы, что отсюда можно сделать вывод о зависимости возникновения органоспецифических антигенов хрусталика от природы закладки данного органа, а не от его функции. Однако И. И. Титовой (1957) было установлено, что антигенные свойства хрусталика, образующегося при его регенерации из радужной оболочки у тритона, оказываются сходными с антигенными свойствами хрусталика, возникающего в ходе нормального развития из презумптивного эпидермиса. Таким образом, И. И. Титовой было показано, что органы, аналогичные как в морфологическом, так и в функциональном отношении, обладают и аналогичными антигенными свойствами, несмотря на свое развитие из различных закладок. В связи с этим вопрос о причинах такого раннего появления антигенов, свойственных дефинитивному хрусталику, остается нерешенным. В данном случае мы имеем пример очень ранней антигенной, а следовательно, и химической, дифференцировки развивающегося органа, когда еще нет никаких морфологических структур, присущих хрусталику, как органу, но уже имеются характерные для него белки.

Для более глубокого изучения процесса становления антигенной структуры развивающегося хрусталика, а также и других органов необходимо применение особых иммунологических методов исследования. С нашей точки зрения, для этих целей наибольший интерес представляет метод, предложенный Кунсом и Капланом (Coons a. Kaplan, 1950), основанный на мечении антител флуоресцентными красками и обработкой этими антителами гистологических срезов. Этот метод для изучения антигенной структуры глаза развивающегося мышинного эмбриона использовала Клейтон (Clayton, 1954); ею было установлено, что на ранних стадиях развития иммунная сыворотка против хрусталика взрослой мыши дает слабую реакцию с мозгом и несколько сильнее с глазной чашей и хрусталиковым пузырьком. Зона наивысшей флуоресценции наблюдалась вокруг полости хрусталикового пузырька. К сожалению, полученные автором данные пока еще не позволяют сделать каких-либо выводов о времени возникновения и точной локализации хрусталиковых антигенов.

В последнее время Клейтон и Фельдман (Clayton a. Feldman, 1955) опубликовали работу, посвященную изучению антигенных свойств тканей глаза 7-дневной мыши. Гистологические срезы обрабатывались иммунными сыворотками против хрусталика взрослой мыши, меченными радиоактивными изотопами ( $KJ^{131}$ ). В результате, было установлено, в частности, что слон сетчатки существенно различаются по количеству связанной сыворотки. Наибольшая активность была в области, включающей пигментный эпителий и наружные части палочек. Эти данные, свидетельствующие об относительно высокой концентрации хрусталиковых белков в пигментном эпителии, представляют интерес для выяснения механизма регенерации хрусталика.

Наряду с изучением процесса становления антигенных свойств целых хрусталиков ряд авторов проводили также исследование антигенных свойств отдельных белковых фракций хрусталика ( $\alpha$ - и  $\beta$ -кристаллинов) в онтогенезе. Зауэр (Sauer, 1939) при помощи реакции преципитации изучал антигенные свойства  $\beta$ -кристаллина хрусталика свиньи в эмбриогенезе. Автором было установлено, что  $\beta$ -кристаллин появляется у эмбрионов свиньи 20—30 мм длиной, и по мере развития хрусталиков возрастает и содержание  $\beta$ -кристаллина. В своей работе Зауэр пытается связать результаты своих опытов с данными по морфогенезу хрусталика человека. Он ссылается на данные Иды Манн (Mann, 1928), которая наблюдала процесс образования первичных хрусталиковых волокон у эмбрионов человека 26—30 мм длиной. Из результатов сопоставления своих данных и наблюдений Иды Манн Зауэр сделал заключение, что появление  $\beta$ -кристаллина в эмбриогенезе совпадает по времени с образованием первичных хрусталиковых волокон. Это положение автора о связи морфогенеза с изменением антигенных свойств органа, несомненно, представляет интерес. Однако для установления такой связи нельзя пользоваться случайными литературными данными, а необходимо проводить параллельное морфо-иммунологическое исследование развивающихся органов.

В последнее время была опубликована другая работа, посвященная изучению антигенных свойств кристаллинов в эмбриогенезе. Зюйдвег (Zuidweg, 1954) при помощи реакции преципитации и метода ультрамикроразделения азота по Кьельдалю изучал общее количество белка и содержание  $\alpha$ -кристаллина у куриных эмбрионов 5—14 суток инкубации. Автором было показано, что количество  $\alpha$ -кристаллина уменьшается в процессе развития. Зюйдвег отмечает, что особенно резкое уменьшение  $\alpha$ -кристаллина происходит примерно с 7 или 8-го дня инкубации.

Таким образом, изложенные данные показывают, что антигенные свойства хрусталиков различных животных изменяются в процессе развития. Другим органом, который послужил для изучения процесса становления органоспецифических антигенов, является сердце. Эберт получал иммунные сыворотки против различных органов взрослой курицы (сердце, мозг, селезенка). Полученные сыворотки адсорбировались кровью и желтком, а также экстрактами из гомологичных и гетерологичных органов и использовались в реакции кольцепреципитации с экстрактами из куриной бластодермы. Иммунные сыворотки против сердца курицы, адсорбированные экстрактами из мозга, не реагировали с экстрактами из куриной бластодермы. В то же время эти же сыворотки после адсорбции их экстрактами селезенки и печени почему-то реагировали с экстрактами из куриной бластодермы. На основании этих наблюдений автор сделал заключение, что органоспецифические антигены сердца и мозга имеют общую природу в ранней куриной бластодерме. Однако позже Эбертом было сделано заключение, что этот общий «сердечно-мозговой» антигенный комплекс возникает в мозге куриного эмбриона лишь на 18-й день инкубации. Таким образом, данные Эберта, опубликованные в 1950 и в 1951 гг., не согласуются один с другим.

Результаты опытов Эберта противоречат также данным Шехтмана, который сообщил, что иммунные сыворотки против мозга 20-дневного куриного эмбриона после адсорбции экстрактами печени теряли способность реагировать с куриной бластодермой. Очевидно, иммунные сыворотки в опытах Эберта были недостаточно адсорбированы экстрактами селезенки и печени. В 1950 г. Эберт изложил также результаты опытов, полученные при помощи метода культуры тканей. Иммунные органоспецифические сыворотки добавлялись в определенных разведениях в среду, на которой культивировались куриные бластодермы. У эмбрионов, культивирующихся на среде, в которую была добавлена сыворотка против сердца курицы, пульсирующих сердец не развивалось. В то же время пульсирующие сердца развивались у эмбрионов, которые культивирова-

лись на среде, содержащей иммунную сыворотку против мозга курицы. Как можно видеть, результаты полученные автором при помощи метода культуры тканей, не согласуются с данными, которые были получены им же при помощи реакции преципитации. Исходя из данных реакции преципитации, следовало ожидать, что иммунные сыворотки против мозга будут оказывать тормозящий эффект на развитие сердца в силу антигенного сходства сердца и мозга на ранних стадиях развития. На основании своих опытов автор сделал заключение, что антигены, специфичные для органов курицы, присутствуют в ранней куриной бластодерме еще до появления соответствующих органов. Следует указать, что самим же Эбертом было отмечено в ряде случаев неспецифическое действие сывороток. Поэтому можно думать, что сыворотки, использованные Эбертом, не обладали достаточно высокой органной специфичностью. Другие авторы также отметили неспецифическое действие иммунных сывороток против различных органов курицы (селезенка, хрусталик) на развитие эмбрионов в культуре (Pomerat, 1949; Flickinger, Levi a. Smith, 1955).

В 1953 г. Эберт опубликовал специальную работу, посвященную изучению антигенных свойств развивающегося сердца курицы. Автор получал иммунные сыворотки против миозина сердечной мышцы курицы и адсорбировал их миозином из скелетной мышцы. При помощи реакций кольцепреципитации и микропреципитации Эберт получил данные, свидетельствующие о том, что миозин сердечной мышцы присутствует в тканях развивающегося сердца эмбрионов 1½, 2, 3, 5, 7, 9, 12, 13, 15 и 18 дней инкубации, а также в курином эмбрионе уже на стадии трех сомитов (12—13 часов инкубации), т. е. в самом начале образования закладки сердца.

Автор утверждает, что сердечный миозин, по-видимому, присутствует на еще более ранних стадиях развития и что он качественно не изменяется в ходе онтогенеза. Это положение Эберта не согласуется с результатами опытов ряда авторов, которые сообщили о качественном изменении сократимых белков в онтогенезе (Иванов и Касавина, 1948; Raebert, Schapira et Dreyfus, 1955; Иванов, Юрьев и др., 1956). В последнее время Эберт, Толман, Ман и Олбрайт (Ebert, Tolman, Mun a. Albright, 1955) опубликовали работу, в которой они сообщили, что миозин дефинитивного сердца курицы можно обнаружить при помощи реакции микропреципитации уже на стадии первичной полоски. Расположен он в эктодерме и отсутствует в энтодерме. Сначала миозин распределен равномерно по всей эктодерме, но уже на стадии головного отростка распределение миозина ограничивается так называемыми «сердце формирующими областями», расположенными на обеих сторонах зародыша. Синтез актина дефинитивного сердца, по данным этих авторов, также начинается очень рано — на стадии головного отростка. Таким образом, синтез сократимых белков, характерных для дефинитивного сердца, по данным Эберта, Толмана, Мана и Олбрайта, начинается еще задолго до образования каких-либо клеточных элементов закладки этого органа.

Однако данные Эберта, Толмана, Мана и Олбрайта не согласуются с результатами опытов Джонсона и Лиона (Johnson a. Leone, 1955), по наблюдениям которых актомиозин дефинитивного сердца можно впервые обнаружить лишь у эмбрионов 40 часов инкубации. Авторы считают, что пульсация сердца до появления актомиозина обусловлена функциональным «предшественником» миозина — «миозиногеном». Изложенные литературные данные показывают, что результаты исследований, посвященных изучению антигенных свойств тканей развивающегося сердца, в настоящее время еще противоречивы.

В результате наших опытов было установлено, что органоспецифические антигены, свойственные дефинитивному сердцу курицы, возникают лишь с 4-х суток инкубации и количество их возрастает в процессе дальнейшего развития (Конюхов, 1957). Морфологическое исследование, про-

веденное нами, показало, что появление органоспецифических антигенов дефинитивного сердца совпадает с периодом коренной морфологической перестройки сердца, как органа кровообращения. Если до 4-х суток инкубации сердце представляет, образно говоря, лишь расширенный пульсирующий сосуд, то после 4-х суток начинается процесс образования 4-камерного сердца со своеобразным гистологическим строением, характерным для дефинитивного сердца. В это время происходит образование перегородок сердца (межжелудочковой и межпредсердной), а синцитиально-клеточное строение миокарда, характерное для трубчатого сердца, заменяется синцитиально-мышечным. После 6 суток инкубации миокард начинает принимать синцитиально-мышечное строение и в нем возникает много поперечно исчерченных дефинитивных миофибрилл. В этот период развития происходит резкое падение темпа роста сердца.

Таким образом, результаты наших опытов говорят в пользу того, что появление органоспецифических антигенов, свойственных дефинитивному сердцу курицы, совпадает по времени с началом процесса образования 4-камерного сердца и предшествует его морфологической дифференцировке. Полученные данные позволяют думать о наличии глубокой связи морфо-физиологических и антигенных изменений тканей в процессе развития. Аналогичного рода данные были получены, как уже указывалось выше, и при изучении хрусталика.

Наши данные согласуются с наблюдениями Хаана (Haap, 1955). Этот автор изучал антигенные свойства мышечных компонентов регенерирующей конечности личинки аксолотля. Он получал иммунные сыворотки отдельно к миозину и актину мышечной ткани конечности аксолотля. Иммунные сыворотки, адсорбированные экстрактами из различных тканей аксолотля, использовались для изучения химической дифференцировки регенерирующей конечности. Наряду с иммунологическим исследованием, проводилось также гистологическое изучение процесса регенерации. Мышечные белки были замечены в бластемах на 29-й день после ампутации конечностей. Гистологическое изучение показало, что в этот период в бластеме появляются пучки вытянутых клеток. В этих клетках в течение следующих 3 дней появляются поперечно исчерченные миофибриллы. Исходя из полученных данных, автор сделал предварительное заключение, что в регенерирующей конечности аксолотля можно обнаружить специфические мышечные белки по крайней мере за 3 дня до того, как можно заметить волокна скелетной мускулатуры.

Таким образом показано, что в развивающихся тканях животных обнаруживаются антигены, возникающие лишь на определенных стадиях онтогенеза и характерные для всех последующих этапов развития.

#### АНТИГЕНЫ, СПЕЦИФИЧНЫЕ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕННЫХ СТАДИЙ РАЗВИТИЯ

Как известно, обмен веществ, тип биосинтеза белка, существенно изменяются в процессе онтогенеза. Каждая стадия развития характеризуется особыми, специфическими взаимоотношениями с внешней средой. Поэтому вполне логично допустить, что на каждой стадии онтогенеза в развивающихся тканях должны возникать антигены, специфичные именно для данной стадии развития. В процессе дальнейшего развития эти антигены должны исчезать и заменяться новыми антигенами, соответствующими новому, стадийно обусловленному характеру биосинтеза.

Ряд данных, полученных отдельными исследователями, подтверждает, по-видимому, это положение и показывает, что в развивающихся тканях содержатся антигены (белки), специфичные только для определенного периода онтогенеза<sup>2</sup>. Было установлено, что кровь эмбрионов кролика и

<sup>2</sup> Во всех разбираемых в этой статье работах антигенное различие развивающихся тканей не связано с наличием в тканях индивидуальных антигенов, так как в опытах использовалось много эмбрионов и индивидуальные антигенные различия нивелировались.

морской свинки по своим антигенным свойствам отличаются от крови соответствующих взрослых животных (Lockemann u. Thies, 1910; Graffenberg u. Thies, 1911; Nattan — Larrier et Richard, 1931).

Педерсен (Pedersen, 1944) обнаружил в сыворотке крови эмбрионов крупного рогатого скота и овец особый белок, названный им фетуином. Автор исследовал физико-химические свойства фетуина и нашел, что молекулярный вес этого белка равен 50 000, а изоэлектрическая точка  $pH = 3,5$  (Pedersen, 1947). Мейерс и Дойч (Meyers a. Deutsch, 1955) провели иммунохимическое исследование фетуина. Путем фракционирования они получили три различные фракции этого белка и изучили их антигенные свойства.

Как уже указывалось, Тельфер и Виллиамс при помощи реакции преципитации в агаре изучали антигенные свойства сыворотки шелкопряда цекропии. Ими было установлено, что пять из шести изученных антигенов присутствуют на протяжении всего метаморфоза, а один антиген не обнаруживается в крови гусениц IV возраста, проявляется в конце V возраста, сохраняется в течение стадии куколки и затем исчезает во время развития бабочки.

Дрильон (Drilhon, 1954), изучая методом электрофореза белковый состав гемолимфы шелкопряда (Bombyx mori), установил, что личиночные белки отличаются от имагинальных. Шейде (Schjeide, 1952) обнаружил в сыворотке крови куриного эмбриона антигены, которые отсутствовали в сыворотке взрослых кур. Маршал и Дойч (Marshall a. Deutsch, 1950) при помощи метода электрофореза показали исчезновение некоторых компонентов сыворотки куриных эмбрионов в процессе развития. Аналогичного рода результаты были получены также Муром, Шеном и Александером (Moore, Shen a. Alexander, 1945). Ж. Г. Шмерлинг и В. Д. Успенская (1955) установили присутствие белков, специфичных для эмбриональной сыворотки кролика и крысы. Аналогичные данные были получены на крысах А. Е. Гурвичем и Н. Г. Корсаевской (1956).

Многими исследователями было показано, что гемоглобин зародышей человека и животных существенно отличается от гемоглобина взрослых особей. Это различие наблюдается по целому ряду признаков, как, например, резистентность к щелочам, сродство к  $CO_2$  и  $O_2$ , химическая структура, конфигурация кристаллов и т. д. (Haurowitz, 1929; McCarthy, 1933; Brinkman, Wildshut a. Wittermans, 1934; Nall, 1934; Brinkman a. Jonkis, 1935, и др.), и, в частности, по своим антигенным свойствам (Darrow, Nowakovsky a. Austin, 1940; Chernofi, 1953; Goodman a. Campbell, 1953; и др.).

Следует отметить, что количество зародышевого гемоглобина к моменту рождения составляет 70—80% от общего количества гемоглобина, но уже в течение первых 5 месяцев постэмбриональной жизни он быстро замещается другим гемоглобином, характерным для взрослого состояния (Beaven a. White, 1953; Shulman a. Smith, 1954). Миллер (Miller, 1953), изучая антигенный состав эритроцитов голубя, установил исчезновение двух антигенов в течение первых месяцев постэмбриональной жизни.

Таким образом показано, что в сыворотке крови и эритроцитах различных видов животных содержатся антигены, характерные лишь для определенного периода развития. Отдельные данные позволяют думать, что то же рода антигены присутствуют и в других развивающихся тканях. Еще в 1914 г. И. Л. Кричевским было установлено, что головастики и личинки различаются по антигенным свойствам. В последнее время данные Кричевского были подтверждены и уточнены Р. Ф. Аверкиной (1956).

В. В. Аврех и Е. С. Геронимус (1937) при помощи реакции преципитации установили, что различные стадии онтогенеза пчел (4- и 9-дневные личинки, куколки, молодые пчелы) отличаются друг от друга по своим антигенным свойствам и что в процессе онтогенеза происходит закономерное изменение этих свойств.

Барки, Салливан, Питерсен и Уид сообщили, что на определенных ста-

дней развития в хрусталике содержатся антигены, характерные только для этих типов развития. Так, по данным этих авторов 96-часовой хрусталик реагирует с сывороткой против 160-часового хрусталика, но не с сывороткой против 300-часового хрусталика, а 120-часовой хрусталик реагирует с сывороткой против 300-часового хрусталика, но не с сывороткой против хрусталика взрослой курицы. К сожалению, авторы не проводили детального морфологического исследования развития хрусталика, вследствие чего присутствие тех или иных антигенов на определенных стадиях эмбриогенеза трудно связать с какими-либо особенностями, характерными для хрусталиков этих стадий. Как известно, морфологическое строение хрусталиков куриных эмбрионов 300 часов инкубации и хрусталиков взрослой курицы очень сходно. Поэтому совершенно не ясно, почему хрусталики эмбрионов 120 часов инкубации реагируют с сывороткой против хрусталиков эмбрионов 300 часов развития, но не с сывороткой против хрусталика взрослой курицы.

Макулла (Maculla, 1948), изучая при помощи реакции связывания комплемента антигенные свойства мышинной селезенки, показала, что сыворотки против дифинитивной селезенки не реагируют с экстрактами из эмбриональной мышинной селезенки. Она сделала заключение, что ткани селезенки эмбрионов и взрослых животных имеют различные антигенные свойства. О. Е. Вязов (1953, 1956, 6) обнаружил в различных органах (печень, почка, селезенка и кишечник) эмбрионов ряда животных (мышь, крыса, свинья, обезьяна) антигены, характерные для определенных этапов эмбрионального развития и отсутствующие в тканях соответствующих взрослых животных. Им было также показано, что содержание этих антигенов изменяется в процессе развития в определенной для каждого органа последовательности. Жакке и Стег (Jacque et Steg, 1954) обнаружили в развивающихся тканях эмбрионов крупного рогатого скота, курицы, крысы и мыши, содержащих большое количество митозов, особый «митотический» антиген. Спар, изучая антигенные свойства различных стадий развития лягушки (бластулы, гаструлы и нейрулы) при помощи реакции преципитации в агаре, показал исчезновение некоторых антигенов на стадиях гаструлы и нейрулы.

Изложенные выше данные позволяют думать, что в тканях животных, находящихся на определенных этапах онтогенеза, содержатся антигены, характерные только для этих этапов развития. К сожалению, большинство авторов, изучавших антигенные свойства развивающихся тканей, не связывали эти специфичные для определенных стадий онтогенеза антигены с морфо-физиологическими особенностями развития.

В результате изучения антигенных свойств развивающегося сердца курицы при помощи реакции анафилаксии с десенсибилизацией нами было установлено, что в тканях сердца 4-суточных эмбрионов содержатся характерные для этих стадий развития антигены, которые затем исчезают и не обнаруживаются у эмбрионов 6 суток инкубации. Эти антигены были названы нами стадиоспецифическими. Морфологическое изучение показало, что в период обнаружения стадиоспецифических антигенов начинается процесс преобразования трубчатого сердца в 4-камерное. В этот период развития наблюдается высокий темп роста ткани сердца, а гистологическое строение миокарда в основных чертах сходно со строением миокарда эмбрионов ранних сроков инкубации. Можно думать, что наличие стадиоспецифических антигенов в этот период развития связано с определенными морфо-физиологическими особенностями трубчатого сердца. Нами была обнаружена также вторая группа стадиоспецифических антигенов. Эти антигены появляются в тканях сердца развивающихся эмбрионов на 10—12-е сутки инкубации и исчезают после вылупления.

В результате изучения антигенных свойств развивающегося хрусталика утки было установлено, что ткань хрусталика эмбрионов 90 и 130 часов инкубации содержит антигены, специфичные лишь для этих этапов разви-

тия. Эти стадиоспецифические антигены исчезают к 8 суткам инкубации и обнаруживаются в дальнейшем на протяжении остального периода эмбриогенеза (Конюхов, 1957, 6). Морфологическое изучение показало, что наличие стадиоспецифических антигенов в ткани хрусталика эмбрионов 90 и 130 часов инкубации совпадают с периодом интенсивного роста первичных хрусталиковых волокон, определяющим наивысший темп роста всего хрусталика, и с наибольшей концентрацией в хрусталике рибонуклеиновой кислоты. Возможно, что присутствие в ткани хрусталика эмбрионов 90 и 130 часов инкубации стадиоспецифических антигенов связано с вышеуказанными морфо-физиологическими особенностями развивающегося хрусталика в этот период эмбриогенеза.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ данных, изложенных в настоящей статье, показывает, что в развивающихся тканях животных можно выделить по крайней мере три основные группы антигенов:

I — антигены, присутствующие на всех этапах развития — видоспецифические антигены; эти антигены отражают видовую специфику процесса развития животных;

II — антигены, возникающие на определенных стадиях развития и присутствующие на всех последующих этапах онтогенеза — органо- (ткане) — специфические антигены; эти антигены характерны для дефинитивных органов (тканей) и отражают морфо-физиологическую специфику развития этих органов (тканей);

III — антигены, присутствующие лишь на определенных стадиях развития, такие антигены были названы нами стадиоспецифическими. Эти антигены отражают, по-видимому, стадийно обусловленную морфологическую и биохимическую разнокачественность одной и той же развивающейся ткани на разных этапах онтогенеза.

В пользу выдвигаемого положения о выделении трех основных групп антигенов говорит вся вышеприведенная литература. Анализ литературных данных показал, что самые различные антигены, обнаруженные в развивающихся тканях, могут быть легко отнесены к той или иной группе. Принадлежность тканевых антигенов к определенным группам более четко показывает их биологическую роль в процессе развития организма.

Изменения этих трех групп антигенов в процессе развития определенным образом связаны одно с другим. Так, ряд авторов считает, что появление одних антигенов совпадает по времени с исчезновением других (Spar, 1953; Beaven a. White, 1953, и др.). Результаты наших опытов также показали, что появление органо-специфических антигенов дефинитивного сердца курицы совпадает с периодом исчезновения стадиоспецифических антигенов, характерных для трубчатого сердца (4—5-е сутки инкубации). Можно думать, что в периоды возникновения и исчезновения тех или иных антигенов, а также в периоды только возникновения новых антигенов происходит изменение типа биосинтеза белков. Следует отметить, что эти же периоды (гастрюляция, нейруляция, 4—5-й день инкубации и др.) совпадают по времени с установленными другими авторами критическими периодами развития (Трифопова, 1930; Petersen, 1956, и др.). Эти данные позволяют нам надеяться, что иммунологическое изучение развивающихся тканей позволит осуществить более точную периодизацию развития животных и выяснить, с чем связаны критические периоды их развития.

Анализ литературы и проведенное нами изучение морфогенеза сердца и хрусталика показали, что изменения антигенов развивающихся органов связаны определенным образом с изменениями морфологической структуры этих органов, и что антигенные изменения, как правило, предшествуют морфологическим. Это свидетельствует о том, что антигенная дифферен-



цировка предшествует морфологической, что соответствует известному положению, согласно которому биохимическая дифференцировка предшествует морфологической. Изучение антигенных свойств развивающихся тканей может способствовать пониманию ранней детерминации органов и их закладок и разъяснению феномена индукции и тех формообразовательных процессов, которые разворачиваются в эмбриогенезе.

## ЛИТЕРАТУРА

- Аверкина Р. Ф. 1956. Сравнительное изучение антигенных свойств тканей животных различных видов на разных стадиях развития. Сообщ. I. Сравнительное изучение антигенных свойств мышечной ткани лягушки (*Rana ridibunda*) и тритона (*Triturus cristatus*). Бюл. эксперим. биол. и мед., 41, 2, 70—74.
- Аврех В. В. и Геронимус Е. С. 1937. Серологический анализ онтогенеза у птиц. Бюл. эксперим. биол. и мед., 4, 6, 505.
- Блиннов Н. И. 1935. Факторы M и N эритроцитов человека и их практическое значение. Вестн. хирургии, 108, 114.
- Вовк С. И. 1938. К вопросу об органоспецифичности печени. Тр. Кафедры патол. физиол. Киевск. мед. ин-та, 6, 93—120. Киев.
- Вязов О. Е. 1952. Введение к изучению иммунологии эмбриогенеза. Успехи соврем. биол., 33, 1, 47—63.—1953. Некоторые данные по изучению антигенных свойств эмбриональных тканей. Бюл. эксперим. биол. и мед., 36, № 8, 55—59.—1956 а. Иммунология эмбрионального развития. В кн. «Проблемы современной эмбриологии», 311—317.—1956 б. Некоторые результаты изучения антигенных свойств эмбриональных тканей. В кн. «Вопросы иммунологии нормальных и злокачественных тканей», 194. М.
- Гурвич А. Е. и Карсаевская Н. Г. 1956. Исследование сывороточных белков в онтогенезе электрофорез преципитатным методом. Биохимия, 21, вып. 6, 746—753.
- Добровольский С. 1907. Ueber Cytotoxine der Ovarien. Gynaek. Rundsch., 3, III.
- Дондуа А. К. 1955. Фагоцитарная и воспалительная реакция на разных этапах онтогенеза, эксперименты на курином зародыше. Докл. АН СССР, 104, № 6, 941—944.
- Жуков-Вережников Н. Н. 1944. Илья Ильич Мечников и биологические основы иммунологии. Успехи соврем. биол., 18, вып. 1, 93—105.—1956. Биологические основы учения об антигенах. Тез. докл. XIII Всесоюз. съезда гигиен., эпидемиол., микробиол. и инфекц., 55—57. Л.
- Земцова О. М. и Терехова А. А. 1928. Групповая антигенная дифференцировка человека в процессе онтогенеза. Тр. микробиол. НИИ Наркомпроса, 4, 238.
- Иванов И. И. и Касавина Б. С. 1948. Сравнительное биохимическое изучение контрактильных белков поперечнополосатых мышц на различных ступенях филогенеза. Докл. АН СССР, 60, 417.
- Иванов И. И., Юрьев В. А., Калыков В. В., Крымская Б. М., Моисеева В. П. и Тукачинский С. Е. 1956. Белки проактомиозинового комплекса в онтогенезе. Докл. АН СССР, 111, № 3, 649—651.
- Конюхов Б. В. 1956 а. Изучение антигенных свойств тканей и органов животных в онтогенезе. Сообщ. I. К вопросу о видовой антигенной специфичности хрусталика. Бюл. эксперим. биол. и мед., 41, 4, 67—69.—1956 б. То же. Сообщ. II. Об органной специфичности хрусталика. Бюл. эксперим. биол. и мед., 41, 5, 59—62.—1956 в. То же. Сообщ. III. Исследование видовой и органной специфичности хрусталика при помощи реакции коагпреципитации. Бюл. эксперим. биол. и мед., 42, 9, 53—59.—1957 а. То же. Сообщ. IV. Исследование видовой и органной антигенной специфичности сердца курицы в эмбриогенезе. Бюл. эксперим. биол. и мед., 43, 6, 77—82.—1957 б. То же. Сообщ. V. О тканеспецифических антигенах хрусталика. Бюл. эксперим. биол. и мед., 44, 12.
- Косыков Л. Н. и Гринбульд П. П. 1939. M и N — антигены человека в процессе эмбриогенеза. ЖМЭИ, 9, 10, 128.
- Кричевский И. Л. 1914. Ein Versuch der Anwendung der Immunitätsreaktionen für des Studium des biogenetischen Grundgesetzes. Zbl. Bakteriол., 72, 81—91.—1916. Опыт применения реакций иммунитета для изучения биогенетического закона. Сообщ. 2. Гетерогенные гемолитины как метод исследования химического состава протоплазмы животных в течение эмбрионального развития. Русск. зоол. ж., 1, 8, 244—253. The relation of immunity reactions to the biogenetic law. Investigations of the chemical structure of the protoplasm of animals during embryonic development by means of heterogeneous hemolysins. J. Infect. Dis., 12, 192—195.
- Лопашов Г. В. и Строева О. Г. 1950. Развитие иммунологических реакций и проблема несовместимости тканей при пересадках. Успехи соврем. биол., 30, вып. 2, 234.
- Мечников И. И. 1950. Untersuchungen über die intracelluläre Verdauung bei wirbellosen Tieren. Избр. произв. Мечникова. Изд. АН СССР, 239—270. (Ориг. в Arbeit



- d. Zool. Inst. Wien. 1883, 8, 1).—1900a. Sur l'influence de l'organisme sur les toxines. Sur la spermotoxine et l'antispermotoxine. 1900b. Ann. de l'Inst. Pasteur, 14, No. 1.
- Шурманов Г. Т. 1952. О дифференциации антигенов животных клеток реакцией агглютинации с десенсибилизацией. Ж. микробиол., эпидемиол. и иммунол., 2.
- Шурманов В. И. 1937. О специфичности иммунных невротоксических сывороток. Тр. Мех. клин. I ММИ, 3, 6 (11), 167—174, М.
- Шатова И. И. 1957. Изучение антигенных свойств хрусталика в процессе вольфовской регенерации у *Triturus taeniatus*. Бюл. эксперим. биол. и мед., 43, 6, 70—73.
- Трифопова А. Н. 1939. Критические периоды эмбрионального развития и осевой физиологический градиент. Архив анатомии, гистол. и эмбриол., XXII, вып. 1, 94—104.
- Файнберг В. Б. 1935. Появление агглютиногенов у человеческих эмбрионов. Казанск. мед. ж., 8—9, 1025—1029.
- Хорошко В. К. 1910. Об анафилаксии к нервной ткани и невротоксинах. Ж. невропатол. и психиатр. им. Корсакова, 5—6, 1560—1574.
- Шмерлинг Ж. Г. и Успенская В. Д. 1955. Об эмбриональных сывороточных белках крысы и кролика. Биохимия, 20, 1, 31—41.
- Beaven G. H. a. White J. C. 1953. Detection of foetal a. sickle cell haemoglobins in human anaemias. Nature, 172, No. 4387, 1006.
- Bornstein S. a. Israel M. 1942. Agglutinogens in foetal erythrocytes. Proc. Soc. Exptl. Biol. and Med., 49, No. 4, 718—720.
- Briles W. E., McGibbon W. H. a. Irwin M. R. 1948. Studies of the time of development of cellular antigens in the chicken. Genetics, 33, No. 1, 97.
- Brinkman R. a. Jonkis J. H. P. 1935. The occurrence of several kinds of haemoglobin in human blood. J. Physiol., 85, 117—126.
- Brinkman R., Wildshut A. a. Wittermans A. 1934. On the occurrence of two kinds of haemoglobin in normal human blood.—J. Physiol., 80, 376—387.
- Burke V., Sullivan N. P., Petersen H. a. Weed R. 1944. Ontogenetic change in antigenic specificity of the organs of the chick. J. Infect. Diseases, 74, 225—233.
- Ten Cate G. a. van Doorenmaalen W. 1950. Analysis of the development of the eye-lens in chicken a. frog embryos by means of the precipitin reaction. Proc. Koninkl. nederl. akad. wet., 53, No. 6, 894—913.
- Chernoff M. D. 1953. Immunological studies of hemoglobins. II. Quantitative precipitin test using anti fetal hemoglobin sera. Blood., 8, No. 5, 413—422.
- Clayton R. M. 1951. Antigens in the developing new embryo. Nature, 168, No. 4264, 120—121.—1953. Distribution of antigens in the developing new embryo. J. Embryol. and Exptl. Morphol., 1, No. 1, 25—42.—1954. Localization of embryonic antigens by antisera labelled with fluorescent dyes. Nature, 174, No. 4440, 1059.
- Clayton R. M. a. Feldman M. 1955. Detection of antigens in the embryo by labelled antisera. Experientia, 11, No. 1, 29—31.
- Coons A. H. a. Kaplan M. H. 1950. Localization of antigens in tissue cells. J. Exptl. Med., 91, No. 1, 1—13.
- Cooper R. S. 1946. Adult antigens (or specific combining groups) in the egg, embryo a. larva of the frog. J. Exptl. Zool., 101, No. 2, 143—172.—1948. A study of frog egg antigens with serum-like reactive groups. J. Exptl. Zool., 107, No. 3, 397—438.—1950. Antigens of frog embryos a. of adult frog serum studied by diffusion antigens into agar columns containing antiserum. J. Exptl. Zool., 114, No. 2, 403—420.
- Darrow R. R., Nowakowsky S., a. Austin M. H. 1940. Specificity of fetal a. adult human hemoglobin precipitins. Arch. Pathol., 30, 873—880.
- Drilhon A. 1954. Etude électrophorétique des protéines de l'hémolymphe du Bombyx mori au cours de son cycle de croissance. C. r. Acad. sci., 238, No. 25, 2452—2454.
- Ebert J. D. 1950. An analysis of the effects of anti-organ sera on the development, in vitro, of the early chick blastoderm. J. Exptl. Zool., 115, No. 2, 351—377.—1951. Ontogenetic change in the antigenic specificity of the chick spleen. Physiol. Zool., 24, N 1, 20—41.—1952. Appearance of tissue-specific proteins during development. Ann. N. Y. Acad. Sci., 55, Art. 2, 67—85.—1953. An analysis of the synthesis a. distribution of the contractile protein, myosin, in the development of the heart. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 39, N 4, 333—344.
- Ebert J. D., Tolman R. A., Mun A. M. a. Albright J. F. 1955. Ann. N. Y. Acad. Sci., 60, Art. 7, 968—986.
- Flickinger R. A. a. Nace G. W. 1952. An investigation of proteins during the development of the amphibian embryo. Exptl. Cell. Res., 3, No. 2, 393—405.
- Flickinger R. A., Levi E. a. Smith A. E. 1955. Some serological experiments relating to the embryonic development of the lens. Physiol. Zool., 28, No. 1, 79—85.
- Goodman M. a. Campbell D. H. 1953. Differences in antigenic specificity of human normal adult, fetal a. sickle cell anemia hemoglobin. Blood, 8, N 5, 422—433.
- Graffenberg E. u. Thies J. 1911. Über die Wirkung des arteigenen foetalen Serums auf normale u. trachtige Meerschweinchen und über Toxizität des Serums im Puerperium. Z. Immunitätsforsch., 9, 749.
- Guggenheim A. 1929. Über Antigenfunktionen der Lipide des Eidotters. Z. Immunitätsf., 61, 361—380.
- Hall F. G. 1934. Hemoglobin function in the developing chick. J. Physiol., 83, 222—228.

- Harding C. V., Harding D. a. Perlmann P. 1954. Antigens in sea urchin hybrid embryos. *Exptl. Cell. Res.*, 6, No. 1, 202—210.
- Haurowitz F. 1929. Über die Spezifität der Hämoglobine u. die v. Krügersche Reaktion. *Z. Physiol. Chemie*, 183, 78—87.
- Idzumi S. 1924. Biochemische u. serologische Untersuchungen v. bebrüteten Hühnereiern. *Mit. a. d. Med. Fak. Univ. Tokyo*, 32, 197.
- Iwae S. 1915. *Mit. med. Ges. zu Fukuoma*, 9, 1. (Needham J. «Chemical embryology», 1931).
- Jacquet J. et Steeg L. 1954. Sur un antigène renfermé dans différents tissus en cours de multiplication cellulaire. *C. r. Acad. sci.*, 239, No. 9, 626—628.
- Johnson J. S. a. Leone C. A. 1955. The ontogeny of proteins of the adult chicken heart as revealed by serological techniques. *J. Exptl. Zool.*, 130, No. 3, 515—554.
- Kemp T. 1930. Über den Empfindlichkeitsgrad d. Blutkörperchen gegenüber isohämagglutininen im Fötalleben u. im Kindesalter bei Menschen. *Acta pathol. et microbiol. scandinav.*, 7, 146—156.
- Lockemann G. u. Thies J. 1910. Über d. Katalasengehalt d. mütterlichen und foetalen Kaninchenblutes und über d. Wirkung d. foetalen Serums auf d. arteigene Tier. *Biochem. Z.*, 25, 120.
- Maculla E. S. 1948. The immunochemistry of mouse tissue components. III. A comparison of the antigenic composition of the embryonic mouse organs with that of adult mouse organs a. with mouse tumors. *Yale J. Biol. and Med.* 20 299—314.
- McCarthy E. F. 1933. A comparison of foetal a. maternal haemoglobins in the goat. *J. Physiol.*, 80, 206—213.
- Mann I. 1923. The development of the human eye. Cambridge.
- Marshall M. E. a. Deutsch H. F. 1950. Some protein changes in fluids of the developing chicken embryo. *J. Biol. Chem.*, 185, 155—161.
- Meyers W. M. a. Deutsch H. F. 1955. Immunological studies of fetuin. *Arch. Biochem. and Biophys.*, 54, No. 1, 38—44.
- Millier W. J. 1953. The time of appearance of species-specific antigens of *Columba guinea* in the embryo of backcross hybrids. *Physiol. Zool.*, 26, No. 2, 124—130.
- Moore D. H., Shen S. C., a. Alexander C. S. 1945. The plasma of developing chick a. pig embryos. *Proc. Soc. Exptl. Biol. and Med.*, 58, 307.
- Nace G. W. a. Schechtman A. 1948. Development of non-vitelloid substances in the blood of the chick embryo. *J. Exptl. Zool.*, 108, 217—234.—1953. Serological studies of the blood of the developing chick embryo. *J. Exptl. Zool.*, 122, No. 3, 423—448.—1955. Development in the presence of antibodies. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 60, Art. 7, 1038—1055.
- Nattan-Larrie L. et Richard L. 1939. Pouvoir antigène du sang foetal. *C. r. Soc. Biol.*, 107, 668.
- Pedersen K. O. 1944. Fetuin, a new globulin isolated from serum. *Nature*, 154, No. 3914, 575.—1947. Ultracentrifugal a. electrophoretic studies on fetuin. *J. Physical. Coll. Chem.*, 51, No. 1, 164—174.
- Perlmann P. a. Gustafson T. 1948. Antigens in the egg a. early developmental stages of the sea-urchin. *Experientia*, 4, 481—482.
- Perlmann P. 1953. Soluble antigens in sea-urchin gametes a. developmental stages. *Exptl. Cell. Res.*, 5, No. 2, 394—399.
- Petersen N. 1956. Die kritischen Perioden beim Ausbrüten der Hühnereier. *Geflügelhof.*, 19, No. 21, 347—348.
- Pomerat C. M. 1949. Morphogenetic effects of spleen antigen a. antibody administrations to chick embryos. *Exptl. Cell. Res.*, Suppl. 1, 578—581.
- Raeber L., Schapira G. et Dreyfus Jean-Claude. 1955. Sur une nouvelle protéine musculaire, la «métamyosine». *C. r. Acad. sci.*, 241, No 15, 1000—1003.
- Rössle R. 1905. Ueber die chemische Individualität der Embryonalzellen. *Münchener med. Wochenschr.*, 52, 1276.
- Sander F. 1953. Absolute Konstanz der Blutgruppen-und Aktoreneigenschaften? *Z. ges. innere Med.*, 8, No. 24, 1106—1114.
- Sauer F. C. 1939. Development of beta crystallin in the pig and prenatal weight of the lens. *Growth*, 3, 381.
- Schechtman A. M. 1947. Antigens of early development stages of the chick. *J. Exptl. Zool.*, 105, No. 3, 329—348.—1948. Organ antigen in the early chick embryo. *Proc. Soc. Exptl. Biol. and Med.*, 68, No. 2, 263—266.—1952. Physical and chemical changes in circulating blood. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 55, Art. 2, 85—97.—1955. Ontogeny of the blood a. related antigens a. their significance for the theory of differentiation. В кн. «Biological specificity and Growth», p. 3—33 Princeton.
- Schechtman A. M. a. Hoffman H. 1952. Serological studies on the origin of globulins in the serum of the chick embryo. *J. Exptl. Zool.*, 120, No. 2, 375—390.
- Schechtman A. M. a. Nishihara T. 1955. The cell nucleus in relation to the problem of cellular differentiation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 60, Art. 7, 1079—1095.
- Schjeide O. A. 1952. Embryonic-specific antigens in the serum of the developing chick embryo. *Doct. Thesis*, 1952. (Cité par Schechtman A. M. 1952).
- Schokaert J. 1929. Sur les hemo-agglutinogènes de Landsteiner. *C. r. Soc. Biol.*, 100, 445.
- Schulman I. a. Smith S. H. 1951. Fetal a. adult hemoglobins in hemolytic disease of the newborn. *Amer. J. Diseases Children*, 87, No. 2, 167—178.

- Spar G. L. 1953. Antigenic differences among early developmental stages of *Rana pipiens*. *J. Exptl. Zool.*, 123, No. 3, 467—497.
- Telfer W. H. a. Williams C. M. 1953. Immunological studies of insect metamorphosis. I. Qualitative a. quantitative description of the blood antigens of *Cecropia* silkworm. *J. Gen. Physiol.*, 36, No. 3, 389—413.
- Telfer A. 1947. An auto-antibody concept of cell structure, growth a. differentiation. *Growth*, 10 (suppl. 6th Sympos.), 7—19. — 1948. Fertilization a. immunity. *Physiol. Revs.*, 28, No. 2, 180—213. — 1955. Ontogeny of immunological properties. В кн. "Analysis of Development", 1955, 556—573. Philadelphia — London.
- Tissot P. 1947. The problem of specificity in growth a. development. *Yale J. Biol. and Med.*, 19, No. 3, 235.—1950. Perspectives in the field of morphogenesis. *Quart. Rev. Biol.*, 25, No. 2, 177—198.—1955. Specificity in growth control. В кн. "Biological specificity and Growth". Princeton.
- Witebsky E. et Szepeszwol J. 1934. Recherch de l'antigene "Forsmann" dans l'oeuf et dans certaines regions de l'embryon de poulet. *C. r. Soc. Biol.*, 115, 1019.
- Woerdeman M. W. 1950. Over de toepassing van serologische methodes in de experimentele embryologie. Verslag. Konink. Neder. akad. wet. (Amsterdam). 59, No. 5, 58. (Цит. по Woerdeman, M. W. 1953). — 1953a. The differentiation of the crystalline lens. *J. Embryol. and Exptl. Morphol.*, 1, No. 3, 301—305. — 1953b. Serological methods in the study of morphogenesis. *Arch. neerl. Zool.*, 10, Suppl. 1, 144—159. — 1955. Immunological approach to some problems of induction and differentiation. В кн. "Biological specificity and Growth". Ed. Butler E. Princeton. 33—35.
- Zuidweg M. H. J. 1954. Quantitative determination of the  $\alpha$ -crystallin fraction of the eye lenses of chick embryos in various stages of development. *Proc. Koninkl. nederl. akad. Wet., Ser. C.*, 57, No. 1, 115—124.

25X1

**Page Denied**

## КОМПЛЕКСИРОВАНИЕ БЕЛКОВ СЫВОРОТОК КРОВИ В РЕЗУЛЬТАТЕ ВОССТАНОВЛЕНИЯ ПОСЛЕДНИХ ЦИСТЕИНОМ В КИСЛОЙ СРЕДЕ

А. Я. КУЛЬБЕРГ

*Отдел биохимии Института эпидемиологии и микробиологии, им. Н. Ф. Гамалея, Москва*

По современным представлениям [1] молекула антитела отличается от молекулы нормального глобулина лишь структурой небольших участков ее поверхности, определяющих их специфические свойства и называемых антидетерминантами.

Исходя из того, что дисульфидный каркас в значительной степени обеспечивает устойчивость структуры белковой глобулы [2], представлялось интересным выяснить, как будет влиять на специфическую активность антител обработка последних восстановителями, частично разрушающими этот каркас или, другими словами, как отразится на специфической активности антител такая деформация их молекул.

Нами было обнаружено, что преципитационные свойства иммунных сывороток нарушаются в значительной степени в результате восстановления цистеином лишь тогда, когда воздействие последнего на белки происходит в кислой среде. В связи с этими наблюдениями представляло интерес исследовать, какие химические и физико-химические изменения сывороточных белков происходят в результате их восстановления в кислой среде.

Настоящая работа посвящена электрофоретическому анализу обработанных подобным образом цельных сывороток крови и их очищенных  $\gamma$ -глобулиновых фракций.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В опытах использовали: нормальную бычью сыворотку и полученные из нее высаливанием сернокислым аммонием фракции альбумина и  $\gamma$ -глобулина, лошадиную противодифтерийную антитоксическую и иммунную ослиную антифлекснеровскую сыворотки.

В качестве восстановителя использовали кристаллическую соль солянокислого цистеина. Сыворотки обрабатывали различными концентрациями цистеина при ряде значений pH, причем длительность контакта с цистеином была равна 1 часу при комнатной температуре, после чего сыворотку подвергали диализу на холоду против большого объема веронал-мединалового буфера, pH 8,6 и  $\mu$  0,1 в течение 35—40 час.

Опыты проводили в аппарате для свободного электрофореза фирмы Хильгера с оптической системой по Фильпоту — Свенсону. Наблюдения оптической границы производили в монохроматическом зеленом свете. Все опыты выполняли в буфере вышеуказанного состава при 4°. Электрофорез проводили при 12 мА и 5,75 В/см.

Определение подвижности белковых фракций производили (по нисходящей границе) по формуле:

$$U = \frac{l}{0,7 \cdot t \cdot E}$$

где  $l$  — расстояние от  $e$  до данной границы в см, 0,7, — увеличение прибора,  $t$  — время в сек.,  $E$  — градиент потенциала.

Относительная концентрация белковых компонентов исследуемой электрофореграммы определяли по методу, описанному Тизелнусом и Кабатом [37] и выражали в весовых процентах.

При сравнении отдельных электрофореграмм, полученных в различных опытах, для анализа использовали белковые растворы одинаковой концентрации (20 мг в мл). Фотосъемку производили через одинаковые промежутки времени с момента начала электрофореза и при одинаковых положениях наклонной щели.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

На рис. 1 представлена электрофореграмма противодифтерийной лошадиной сыворотки спустя 90 мин. с момента начала электрофореза. На ней видны 4 основные компонента этой сыворотки (за исключением  $\alpha$ -глобулина), подвижность которых, вычисленная, как и в остальных

Рис. 1. Электрофореграмма лошадиной иммунной сыворотки.  
Восходящая граница, 90 мин. электрофореза



случаях, по нисходящей границе на основании трех параллельных опытов, указана в табл. 1. Необходимо оговориться, что здесь, как и в остальных опытах, мы не стремились получить полное электрофоретическое разделение всех белков сывороток, ибо нас интересовало поведение лишь крайних по подвижности компонентов: альбумина и  $\gamma$ -глобулинов. При сравнении вышеуказанной электрофореграммы с электрофореграммой противодифтерийной лошадиной сыворотки, обработанной 1,66%-ным цистеином при pH 3,7 (рис. 2), можно обнаружить весьма большие различия. Действительно, на этой электрофореграмме обнаруживается новый D-компонент с подвижностью, близкой к  $\gamma$ -глобулинам, наряду со значительным уменьшением пиков альбумина ( $\sim 33\%$ ) и  $\beta$ -глобулина и полным исчезновением  $\gamma$ - и  $\gamma_2$ -глобулинов.

Рис. 2. Электрофореграмма лошадиной иммунной сыворотки, обработанной 1,66%-ным цистеином при pH 3,7.  
Восходящая граница, 90 мин. электрофореза



Вышеуказанные изменения не наблюдались при обработке лошадиной сыворотки 1,66%-ным цистеином при pH 4,7.

В результате восстановления 1,66%-ным цистеином при pH 3,7 (рис. 3, 4) нормальной бычьей сыворотки также происходит образование

Рис. 3. Электрофореграмма нормальной бычьей сыворотки.  
Нисходящая граница, 70 мин. электрофореза



нового D-компонента с подвижностью, промежуточной между  $\alpha$ - и  $\beta$ -глобулинами (табл. 2). Одновременно происходит уменьшение пика альбумина ( $\sim 29\%$ ) и исчезновение  $\alpha$ - и  $\beta$ -глобулинов. Что же касается пика

Рис. 4. Электрофореграмма нормальной бычьей сыворотки, обработанной 1,66%-ным цистеином при pH 3,7.  
Нисходящая граница, 65 мин. электрофореза



$\gamma$ -глобулина, то, сохранив прежнюю подвижность, он значительно уменьшается по величине ( $\sim 50\%$ ). Одновременно обнаруживается заметная электрофоретическая гетерогенность остатка  $\gamma$ -глобулина и чрезвычайно медленное отделение его от D-компонента (полное обособление его не происходило даже после 3 часов электрофореза).

Таблица 1

Электрофоретическая подвижность и относительная концентрация белковых компонентов ослиной и лошадиной иммунных сывороток, обработанных цистеином при разном pH

Типы сывороток	Электрофоретическая подвижность $\mu/\text{ч} = 10^{-4} \text{ см}^2 \text{ сек}^{-1} \text{ В}^{-1}$						Относительная концентрация белковых компонентов (в ас. %)					
	альбу- мин	глобулины				D	альбу- мин	глобулины				D
		$\alpha$	$\beta$	$\gamma$	$\delta$			$\alpha$	$\beta$	$\gamma$	$\delta$	
Лошадиная неизмененная сыворотка	7,8	—	5,3	3,2	1,3	—	24,0	—	19,0	47,2	9,8	—
Лошадиная сыворотка, обработанная 1,66%-ным цистеином при pH 3,7	7,6	—	5,4	—	—	3,4	16,0	—	9,2	—	—	74,8
Лошадиная сыворотка, обработанная 1,66%-ным цистеином при pH 4,7	7,8	—	5,3	3,2	1,3	—	24,2	—	19,0	47,0	9,8	—
Ослиная неизмененная сыворотка	8,9	6,3	5,3	—	2,9	—	25,2	21,7	7,2	—	45,9	—
Ослиная сыворотка, обработанная 1,66%-ным цистеином при pH 3,7	8,8	—	—	—	—	3,9	19,8	—	—	—	—	80,0
Ослиная сыворотка, обработанная только HCl при pH 3,7	8,3	6,5	5,3	—	2,7	—	25,1	13,8	11,7	—	49,4	—

При восстановлении 1,66%-ным цистеином при pH 4,7 нормальной бычьей сыворотки ее электрофоретическая картина ничем не отличается от картины необработанной сыворотки.



Рис. 5. Электрофореграмма нормальной бычьей сыворотки, обработанной только HCl до pH 3,7.  
Нисходящая граница: 65 мин. электрофореза

При электрофорезе бычьей сыворотки, обработанной только HCl до pH 3,7 (рис. 5), не появляется новый электрофоретический компонент, не изменяется величина пика альбумина, а наблюдается лишь «смазанность» глобулинового спектра электрофореграммы. В результате обработки 1,66%-ным цистеином при pH 3,5 смеси бычьего  $\gamma$ -глобулина и



Рис. 6. Электрофореграмма смеси бычьего сывороточного альбумина и  $\gamma$ -глобулина.  
Нисходящая граница: 65 мин. электрофореза

альбумина с небольшой примесью  $\alpha$ -глобулина, взятых в отношении 1:1 (рис. 6, 7), были получены изменения, аналогичные обнаруженным в цельной сыворотке, при этом полностью исчезал  $\gamma$ -глобулин, а новый  $\delta$ -компонент составлял более 79% всех белков обработанной смеси. В то же время при обработке 1,66%-ным цистеином при pH 3,5 изолированного бычьего  $\gamma$ -глобулина не происходило ни изменения его подвижности, ни величины пика по сравнению с контролем.

Восстановление иммунной ослиной сыворотки при pH 3,7 (табл. 1) приводило к уменьшению пика альбумина одновременно со сливанием всех глобулиновых компонентов сыворотки в один весьма диффузный пик, разделение которого не происходило даже после 3,5 часов электрофореза.

Таблица 2

Электрофоретическая подвижность и относительная концентрация белковых компонентов нормальной бычьей сыворотки, подвергнутой воздействию цистеина при различном pH

Типы сывороток	Электрофоретическая подвижность $\times 10^{-4} \cdot \text{см}^2 \cdot \text{сек}^{-1} \cdot \text{V}^{-1}$					Относительная концентрация белковых компонентов (в вес. %)				
	альбу- мин	глобулины			D	альбу- мин	глобулины			D
		$\alpha$	$\beta$	$\gamma$			$\alpha$	$\beta$	$\gamma$	
Неизменная сыворотка	9,5	7,0	4,4	3,1	—	36,0	15,0	20,0	29,0	—
Сыворотка, обработанная 1,66%-ным цистеином при pH 3,7	9,5	—	—	3,1	5,9	25,7	—	—	14,3	60,0
Сыворотка, обработанная 0,83%-ным цистеином при pH 4,8	9,5	7,0	4,4	3,1	—	34,8	14,8	21,5	28,9	—
Сыворотка, обработанная HCl до pH 3,7	9,5	6,37	—	—	—	35,9	34,0	30,1	—	—
Система из альбумина и $\gamma$ -глобулина	9,38	6,0	—	3,3	—	27,2	9,6	—	—	63,2
Система из альбумина и $\gamma$ -глобулина, обработанная 1,66%-ным цистеином при pH 3,5	9,38	—	—	—	4,4	20,9	—	—	—	79,1
Сыворотка, обработанная 1,66%-ным цистеином и MIA	8,9	5,8	—	3,1	—	36,7	27,1	$\beta + \gamma$ 36,2	—	—
Сыворотка, обработанная 1,66%-ным цистеином, отдаленная и обработанная MIA	8,9	—	—	3,1	5,0	33,7	—	—	20,3	46,0

При анализе изменений, возникающих в электрофоретической картине сыворотки в результате восстановления, последние могут быть с достаточным основанием объяснены как результат комплексирования

Рис. 7. Электрофореграмма смеси бычьего сывороточного альбумина и  $\gamma$ -глобулина, обработанных 1,66%-ным цистеином при pH 3,5. Нисходящая граница, 65 мин. электрофореза



альбумина и глобулинов. Действительно, появление нового компонента сыворотки с промежуточной подвижностью между  $\gamma$ -глобулином и альбумином сопровождается полным или почти полным исчезновением  $\gamma$ -глобулина и тем или иным уменьшением пика альбумина. Важно подчеркнуть при этом, что действие в тех же условиях цистеина на изоли-



рованный  $\gamma$ -глобулин не приводит к изменению его электрохимических свойств, появление же нового  $\beta$ -компонента возможно лишь в присутствии альбумина. Комплексообразование альбумина и глобулинов не является результатом действия на сыворотку кислоты, что доказывается соответствующими контрольными опытами.

Каков же механизм комплексообразования альбумина и глобулина? По нашим представлениям комплексообразование альбумина и глобулина происходит за счет освободившихся при восстановлении белков сульфгидрильных групп в нейтральной или слабощелочной среде после удаления избытка восстановителя. Что касается характера связи, то, вероятно, молекулы альбумина и глобулина соединены в комплексе главным образом за счет дисульфидных связей, образующихся в результате реокисления сульфгидрильных групп.

Если процесс протекает именно так, то существует возможность воспрепятствовать образованию комплекса путем блокирования их SH-групп после восстановления белков, но перед удалением избытка восстановителя.

В качестве такого блокирующего средства мы избрали моноиодацетат (МИА), необратимо алкилирующей только SH-группы белка.  $\text{KN}_2\text{COO}^- + \text{белок} - \text{SH} - \text{белок} - \text{S} - \text{CH}_2\text{COO}^- + \text{H}^+ + \text{I}^+$ . Обычно эта реакция проводится при pH 7—8,  $t$  от 0 до 25°, в течение 0,5—2 час.

Опыт ставили следующим образом: к восстановленной обычным способом сыворотке через 1 час после введения восстановителя прибавляли избыток 0,5  $N$  нейтрального раствора (МИА), и pH реакционной смеси осторожно доводили до 7,0. После полуторачасовой экспозиции при комнатной  $t$  сыворотку подвергали продолжительному диализу против веронал-мединалового буфера, pH 8,6 и  $\mu$  0,1, после чего исследовали электрофоретически. Предварительные эксперименты показали, что используемые концентрации МИА при воздействии на необработанную сыворотку не изменяют электрофоретической картины последней, лишь незначительно уменьшая подвижность ее альбуминовой фракции.

Полученные данные (рис. 8) полностью подтвердили выдвинутое нами предположение. Действительно, при такой постановке опыта комплекс альбумин-глобулин не образуется и обнаруживающиеся при электрофореze изменения полностью совпадают с изменениями, отмеченными при действии на сыворотку только соляной кислоты (рис. 5), ибо влияние этого фактора мы исключить не могли.

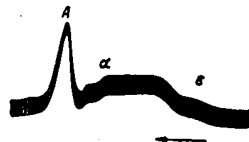


Рис. 8. Электрофореграмма нормальной бычьей сыворотки, обработанной 1,66%-ным цистеином при 3,7 и МИА. Нисходящая граница, 65 мин. электрофореза

Представлялось интересным в связи с этим выяснить будет ли влиять МИА на уже образовавшийся комплекс альбумин-глобулин. Если действительно альбумин и глобулин соединены в комплексе дисульфидной связью, то МИА, являющийся реагентом на SH-группу, не должен приводить к разрушению уже возникшего комплекса.

Для проверки этого предположения порцию бычьей сыворотки обрабатывали обычным способом 1,66%-ным цистеином при pH 3,7, после чего диализовали против вероналового буфера pH 8,0. После диализа сыворотку делили на 2 части, одну из которых обрабатывали МИА, который добавляли в избытке. После 90 мин. экспозиции при комнатной  $t$  обработанную МИА и необработанную порции сыворотки диализовали отдельно против веронал-мединалового буфера, pH 8,6 и  $\mu$  0,1, на холоду в течение 30 час., после чего подвергали электрофорезу.

Электрофореграмма контрольной пробы ничем не отличалась от электрофореграмм, полученных ранее: на ней обнаруживался комплекс альбумин-глобулин, наряду с соответствующим уменьшением пика альбумина и  $\gamma$ -глобулина. Что же касается электрофореграммы восстановленной сыворотки, обработанной МИА (рис. 9), то при анализе ее можно

было отметить частичный распад комплекса альбумин-глобулин, сопровождавшийся нарастанием как пика альбумина, величина которого теперь была лишь на 6% меньше нормальной, так и заметным увеличением пика  $\gamma$ -глобулина (42%). Аналогичные результаты были получены и в опытах с ослиной иммунной сывороткой.

Рис. 9. Электрофореграмма нормальной бычьей сыворотки, обработанной 1,66%-ным цистеином, отнализированной и подвергнутой воздействию МИА. Нисходящая граница, 65 мин. электрофореза



Как показали серологические исследования, иммунная сыворотка, утратившая в результате восстановления свои преципитирующие свойства, после обработки МИА, вновь приобретала способность преципитироваться специфическим антигеном.

Таким образом, полученные в последнем эксперименте данные приносят еще одно доказательство в пользу того, что возникающий при восстановлении сывороток новый компонент представляет собой комплекс альбумин-глобулин, ибо при разрушении его под воздействием МИА происходит увеличение как альбуминового, так и глобулинового компонентов сыворотки.

С другой стороны, вышеуказанный опыт ставит под сомнение возможность соединения альбуминового и глобулинового компонентов в комплексе через дисульфидную связь и тем самым оставляет открытым вопрос о природе связи между альбумином и глобулином.

#### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Как показали опыты с МИА комплексирование альбумина и глобулинов происходит главным образом за счет сульфгидрильных групп, возникающих в результате восстановления белков цистеином. Однако подобный процесс имеет место лишь при восстановлении белков в кислой среде и не возникает при обработке последних цистеином при pH, близком к нейтральному. По-видимому, условия кислой среды, приводящие к деформации и набуханию белковой глобулы [2], облегчают атакуемость дисульфидных связей белка цистеином. Это предположение находит свое подтверждение в работе Маркуса и Каруша [4], которые показали, в частности, что набухание белковой глобулы под влиянием детергентов (децилсульфат) способствует разрыву значительно большего числа дисульфидных связей при восстановлении белка, чем при изолированном действии восстановителя.

Необходимо указать, что комплексирование альбумина и глобулинов отмечалось электрофоретически при воздействии на сыворотку ряда разнообразных агентов, например: нагревания до 65° [5], действия УФ-лучей [6], фотоокисления [7] и некоторых других. Проведенные во всех этих случаях наряду с электрофоретическими и иммунологическими опыты обнаружили глубокое нарушение преципитирующих свойств антисывороток в результате подобных воздействий.

Сопоставление вышеуказанных данных с полученными нами результатами свидетельствует об их значительном параллелизме и дает нам достаточные основания присоединиться к выдвинутому рядом авторов положению [7; 8], согласно которому комплексирование иммунных белков с альбумином приводит к глубокому нарушению серологических свойств антисывороток.

#### ВЫВОДЫ

Действие на сыворотку восстановителя (цистеина) в кислой среде приводит к значительным изменениям физико-химических свойств бел-

ков, что сопровождается комплексированием альбумина и глобулинов. Комплекс альбумин-глобулин возникает за счет химических связей, в образовании которых основную роль играют освобождающиеся при восстановлении белка сульфгидрильные группы.

Поступила в редакцию  
30. III. 1958

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Pauling L., J. Amer. Chem. Soc. 62, 2643, 1940.
2. Горючаева Л. Б., Бреслер С. Е. и Френкель С. Я., Биохимия 22, 70, 1957.
3. Tiselius A., Kabat E. A., J. Exptl. Med. 69, 119, 1939.
4. Marcus G., Karush F., J. Amer. Chem. Soc. 79, 134, 1957.
5. Van der Scheer J., Wyckoff R. W. G., Clarke F. L., J. Immunol. 40, 39, 1941.
6. Davis B. D., Hollaender A., Greenstein I. P., J. Biol. Chem., 146, 663, 1942.
7. Tyler A., Swingle S. M., J. Immunol. 51, 339, 1945.
8. Kleczkowski A., Brit. J. Exptl. Pathol. 22, 188, 1941; 35, 402, 1954.

#### ELECTROPHORETIC ANALYSIS OF CYSTEINE TREATED BLOOD SERA

A. Ya. KULBERG

*Institute of Epidemiology and Microbiology, Academy of Medical Sciences of the USSR,  
Moscow*

Reduction of blood serum by cysteine in an acid medium results in the appearance of a new electrophoretic component with a mobility intermediate between that of albumin and  $\gamma$ -globulin along with an appreciable drop of the albumin and  $\gamma$ -globulin peaks. The appearance of the new component is also elicited by cysteine treatment of a mixture of isolated albumin and  $\gamma$ -globulin but not by the reduction of  $\gamma$ -globulin alone. Partial breakdown of the new component is accompanied by an appreciable rise of the peak both of albumin and  $\gamma$ -globulin. The new component might therefore be regarded as an albumin-globulin complex.

Monoiodoacetate experiments showed that the formation of the above complex is accomplished at the expense of SH-groups released upon reduction of proteins.